

的释放有明显的缓释效果。脂质体制剂在前 4 h 的累积释放量为 50.98%左右,而作为对比的溶液剂在 2 h 就释放了 76%的药物。另外,药物从脂质体中的释放表现为两个释放相。前 0.5 h 内脂质体制剂中药物的释放速率很快与溶液剂中药物的释放速率相似,而在 0.5~18 h,脂质体制剂中的药物释放比较缓慢。

4 结论

本试验采用薄膜分散法制备黄芩苷脂质体,通过对脂质体制备工艺中各个因素的考察发现,磷脂的组成、药脂比、水化时间以及水化温度是影响脂质体包封率的主要因素。当以 SPC(Epikuron 200 PC)为原料,黄芩苷与磷脂的质量比为 1:10,水化温度为 25℃,水化时间为 30 min 时,制得脂质体平均粒径为 168 nm,包封率为 63.25%,并且体外释放具有缓释的特点。

参考文献:

- [1] 延卫东,王瑞君,何 淡,等.黄芩苷药理作用研究进展[J].陕西中医,2002,12:1127-1129.
- [2] 崔 岚,袁 静,王平全.黄芩苷药理作用研究进展[J].中国医院药学杂志,2000,11:685-686.
- [3] 何 心,石跃辉,石春伟,等.黄芩在大鼠体内的药动学研究[J].中国药学杂志,1998,33:232-234.
- [4] 陆 彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版,1998,107.
- [5] 高晓黎,季兴梅.葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的条件筛选[J].中国药学杂志,2003,38:515-517.
- [6] 王 弘,陈济民,张清民.黄芩苷的物化常数测定[J].沈阳药科大学学报,2000,3:105-106.

西黄丸对肝癌细胞 SMMC7721 分泌的血管内皮生长因子及基质金属蛋白酶 2、9 的影响

金沈锐¹, 张新胜², 祝彼得¹, 秦旭华³

(1. 成都中医药大学 基础医学院 生物化学与分子生物学教研室,四川 成都 610075; 2. 河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007; 3. 成都中医药大学 药学院 中药教研室,四川 成都 610075)

关键词:西黄丸;抗肿瘤;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶

中图分类号:R285.6

文献标识码:B

文章编号:1001-1528(2008)07-1079-02

西黄丸为中医传统抗癌名方,功效活血化瘀、清热解毒、消肿止痛。临床文献报道:西黄丸用于乳腺癌、肝癌、白血病等多种恶性肿瘤的治疗,取得了肯定的疗效^[1]。在既往的研究中发现,西黄丸可抑制肿瘤细胞的生长,为了进一步研究其抑瘤的机理,我们采用体外实验的方法,对其抗肿瘤血管生成和转移的作用进行了研究,具体实验如下。

1 材料

1.1 药物 西黄丸,九寨沟天然药物集团有限公司生产,批号:030501。西黄丸浸提液制备方法:采用密闭容器,以预冷 4℃的 RPMI1640 培养液浸泡西黄丸 24h(比例为 0.1g/mL),超声振荡助溶 2h,复以 4℃下继续浸泡 48h 后取上清液,用 0.22μm 微孔滤器过滤后,得到西黄丸浸提液。实验时用 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度使用。

1.2 主要试剂 血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 试剂盒,晶美生物技术有限公司,批号:20050901。次分子量的标准蛋白 Marker,中国科学院上海生物化学研究所,批号:

040509;考马斯亮蓝蛋白定量测定试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号:20041215。明胶 G-2500 Sigma 公司;甲叉双丙烯酰胺,Fluka 公司;考马斯亮蓝 R250 Coomassie 公司;十二烷基硫酸钠、曲拉通 X-100 Sigma 公司;Tris 缓冲盐 Boehringer Mannheim 公司;四甲基乙二胺 ACROS ORGANICS 公司;溴酚蓝 MBCHEM 公司;丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵,成都科龙化工试剂厂;1640 培养基 Gibco 公司;胰蛋白酶 Serva 公司;新生小牛血清,三利生物制品厂。

1.3 细胞株 人原发性肝癌细胞株 SMMC7721,由本校病理教研室提供;用含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基培养。

1.4 主要仪器 Thermo Labsystems Multiskan MK3 全自动酶标仪;Thermo Labsystems Wellwash 4MK2 全自动洗板机。Heraeus Biofuge Stratos 低温高速离心机;Heraeus Biofuge pico 台式离心机;BD-RAD 凝胶分析系统;BD-RAD PowerPac Basic™ 电泳仪;BD-RAD 垂直电泳槽;Sartorius Professional

收稿日期:2007-06-12

基金项目:四川省教育厅重点课题(07ZA019);成都中医药大学科技发展基金(2003ZR01)。

作者简介:金沈锐(1968-),男,副教授,博士,研究方向:中药抗肿瘤。电话:028-88055894, E-mail: jinshenr@yahoo.com.cn

Meter PP-15酸度计。

2 方法

2.1 分组 实验分对照组(含人肿瘤细胞)、实验组(含人肿瘤细胞和西黄丸浸提液)。

2.2 实验方法 取对数生长期的 SMMC7721, 0.25%胰蛋白酶消化,计数细胞,用 1640培养基稀释成 5×10^5 /mL 浓度的单细胞悬液,然后取每孔 1 000 μ L,接种到 6孔板上,置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中,培养 6 h待细胞贴壁后,设对照组、实验组(设两个浓度 100 μ L/mL、200 μ L/mL),对照组用等体积 1640培养液代替西黄丸浸提液,均设 4复孔。实验组加入不同浓度的药物,每孔 200 μ L。6孔板置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂,饱和湿度的细胞培养箱中,分别于培养 5 d、7 d后。吸取培养液,经 4 1 200 r/min离心 10 min,吸上清液。分别进行 MMP2、MMP9 酶谱电泳检测和 VEGF ELISA 检测(按试剂盒说明书进行)。

2.3 mmp2、mmp9酶谱电泳检测方法 参照文献方法^[2,3]制备分离胶和浓缩胶,静置待其凝固,将胶固定到垂直电泳槽上,每槽加样量为 30 μ g蛋白质(考马斯亮兰法测定培养上清液中的蛋白浓度);进行电泳(稳流 20 mA),电泳完毕后,取下胶板,将胶板放入洗涤液中洗涤 2次,30 min/次;再用双蒸水洗涤 2次,5 min/次;放入孵育液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h后取出;放入固定液中固定 30 min;放入染色液中染色 2 h;将胶板放入脱色液中脱色至酶活性区域清晰透亮;最后将胶板置入 BD-RAD凝胶分析系统上进行拍照,并进行图像分析,图像分析软件使用 BD-RAD公司的 Quantity One version4.40,分析条带的光强度(intensity, NT)和面积(mm²),并用 NT \times mm²的均值进行比较。

表 2 西黄丸对 SMMC7721细胞分泌 MMP2、MMP9活性的影响(5 d)(n=4)

浸提液浓度 / μ L/mL	p _{rr} MMP-9 NT \times mm ²	MMP-9 NT \times mm ²	p _{rr} MMP-2 NT \times mm ²
0	5 394.48 \pm 880.30	4 391.09 \pm 795.63	12 121.60 \pm 525.99
100	4 528.80 \pm 372.07	4 000.90 \pm 553.29	9 682.35 \pm 920.32
200	4 008.21 \pm 633.73*	2 920.46 \pm 217.08*	7 303.43 \pm 746.72**

与对照组比较: * P < 0.05; ** P < 0.01。

表 3 西黄丸对 SMMC7721细胞分泌 MMP2、MMP9活性的影响(7 d)(n=4)

浸提液浓度 / μ L/mL	p _{rr} MMP-9 NT \times mm ²	MMP-9 NT \times mm ²	p _{rr} MMP-2 NT \times mm ²
0	2 920.14 \pm 489.33	2 610.02 \pm 362.82	8 301.18 \pm 1 091.83
100	2 745.44 \pm 397.10	1 928.34 \pm 181.46**	6 057.93 \pm 583.75**
200	1 930.61 \pm 322.80*	1 476.37 \pm 113.85**	3 179.19 \pm 245.78**

与对照组比较: * P < 0.05; ** P < 0.01。

4 讨论

西黄丸又称犀黄丸,由牛黄、麝香、乳香、没药 4味中药组成,为中医传统抗癌名方。目前西黄丸在多种恶性肿瘤治疗中取得了肯定的疗效,临床报道较多,但对于西黄丸抑癌

2.4 统计学方法 用《中国医学百科全书·医学统计学》统计软件包 PEMS3.1进行。

3 结果

3.1 西黄丸对 SMMC7721细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)的影响: (见表 1)。在两个时间点 5 d、7 d上,西黄丸浸提液(100 μ L/mL、200 μ L/mL)可显著降低 SMMC7721分泌的 VEGF水平,与对照组比较有显著统计学意义(P < 0.05; P < 0.01),且抑制作用具有一定的剂量依赖关系。

表 1 西黄丸对 SMMC7721细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)水平的影响(n=4)

浸提液浓度 / μ L/mL	培养液中 VEGF 含量 5 d/pg/mL	培养液中 VEGF含量 7 d/pg/mL
0	410.33 \pm 73.80	1843.00 \pm 372.81
100	245.23 \pm 92.66*	1326.38 \pm 274.48
200	80.13 \pm 107.93**	536.15 \pm 369.40*

与对照组比较: * P < 0.05; ** P < 0.01。

3.2 西黄丸对 SMMC7721细胞分泌基质金属蛋白酶 2、9(MMP2、MMP9)的影响: (见表 2、3)。在 5 d时间点上,西黄丸浸提液 200 μ L/mL可显著地降低 SMMC7721分泌的 p_{rr}MMP-9、MMP-9、p_{rr}MMP-2活性,与对照组比较有显著统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。在 7 d时间点上,抑制作用表现较 5 d时间点更为明显,西黄丸浸提液 100 μ L/mL、200 μ L/mL均显著地降低 SMMC7721分泌的 p_{rr}MMP-9、MMP-9、p_{rr}MMP-2活性,与对照组比较有显著统计学意义(P < 0.05, P < 0.01),且抑制作用具有一定的剂量依赖关系。

作用的机理鲜有涉及。因此,开展西黄丸实验研究,不仅有助于了解其作用环节和机理,更好地指导临床用药,且对进一步从传统验方中开发新的抗肿瘤药物也极有价值。

在恶性肿瘤的发生、生长、转移的过程中,血管生成和肿

瘤转移是两个密切相关的环节。故我们选择了与此环节高度相关的指标:血管内皮细胞生长因子、基质金属蛋白酶 2、9,采用西黄丸的低温浸提液,直接加入肿瘤细胞培养基的体外实验方法,来研究西黄丸对血管生成和转移的影响。

需特别说明的是,我们也曾多次尝试采用西黄丸含药血清方法进行体外实验,但由于动物种类、采血时间及动物血清中干扰成分和因素众多,常常导致实验结果不能重复。最终我们选择制备西黄丸的低温浸提液,进行体外实验研究。经多次实验,结果稳定,可重复性良好,且浸提液与药效表现出一定的剂量依赖关系,故我们认为低温浸提液制备的方法,也是不失为中药复方体外实验的一种尝试和探索。

4.1 西黄丸对 SMMC7721 分泌的血管内皮细胞生长因子(VEGF)含量的影响

肿瘤血管生成是肿瘤发生、发展、转移的必要条件^[4],而在肿瘤细胞分泌的肿瘤血管生成因子中,最重要的是血管内皮细胞生长因子(vessel endothelium growth factor, VEGF), VEGF是一种内皮细胞分裂原,它选择性刺激内皮细胞分裂,促使新生血管形成,增加微血管的通透性,刺激细胞外基质降解,使肿瘤组织呈侵袭性生长,从而继发局部浸润和远处转移。故 VEGF成为目前抗肿瘤血管生成治疗中最为热门的靶分子^[5,6]。

本次实验显示:在两个检测时间点 5 d、7 d上,西黄丸浸提液可显著地降低 SMMC7721分泌的 VEGF水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示西黄丸可抑制肿瘤细胞 VEGF的合成,从而抑制肿瘤新生微血管形成,发挥抑瘤和抗转移的效应。

4.2 西黄丸对 SMMC7721 分泌基质金属蛋白酶类(MMPs)水平的影响

在肿瘤的浸润和转移的过程中,细胞外基质的降解也是关键环节之一。基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)是一个蛋白水解酶家族,几乎能降解所有的基底膜骨架成分,在肿瘤浸润、转移和血管形成过程中发挥重要作用^[7]。基质金属蛋白酶 2(MMP-2)在肿瘤细胞介导的细胞外基质降解中起关键作用^[8]。基质金属蛋白酶 9(MMP-9)也可以通过细胞外基质和基底膜的降解作用和增强肿瘤新生血管形成的作用,从而促进肿瘤细胞的侵袭和转

移^[9]。

本次实验结果显示:在 5、7 d时间点上,西黄丸浸提液 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 可显著降低 SMMC7721 分泌的 pMMP-9、MMP-9、pMMP-2 水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),其表现对 MMP-2 分泌的影响更为明显。提示:西黄丸可抑制肿瘤细胞 MMP-2、MMP-9 的分泌,从而抑制恶性肿瘤降解基底膜骨架成分的能力,进一步阻止肿瘤细胞的侵袭、转移,达到治疗肿瘤的目的。

上述两方面研究结果表明,传统抗癌名方西黄丸可抑制肿瘤细胞分泌 VEGF 及 MMP-2、MMP-9,从而具有一定的抗肿瘤血管生成和抗肿瘤转移的作用。目前国内具有明确抗肿瘤转移的中成药不多,西黄丸所表现出的抗肿瘤转移作用,值得我们进一步验证和研究。

参考文献:

- [1] 何欣,黄立中.犀黄丸临床应用及实验研究进展[J].湖南中医药导报,2003,9(4):82-84.
- [2] Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases [J]. *Anal Biochem*, 1994, 218: 325-329.
- [3] 孙晓敏,董卫国,余保平,等.恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析[J].世界华人消化杂志[J].2004,12(2):376-378.
- [4] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. *Nature Med* 1995, 1: 27-31.
- [5] 孙军辉,滕皋军.抗肿瘤血管生成机制及治疗研究进展[J].实用肿瘤学杂志,2005,19(6):459-461.
- [6] 陈信义,徐力,张燕明等.恶性肿瘤新生血管研究进展[J].癌症进展杂志,2005,3(6):528-533.
- [7] Zucke S, Hymowitz M, Rolfe E E, et al. Tumorigenic potential of extra cellular matrix metalloproteinase inducer [J]. *Am J Pathol* 2001, 158 (6): 1921-1928.
- [8] 鹿娜,高社军.基质金属蛋白酶-2在肿瘤转移和复发中的作用[J].河北医科大学学报,2005,26(6):709-711.
- [9] 刘文健,王哲海.抗肿瘤血管形成靶向治疗研究进展[J].肿瘤防治杂志,2004,10(4):427-429.

痛泻二草方对溃疡性结肠炎模型大鼠肠黏膜病理损伤的影响

梁玉杰¹, 段永强^{1*}, 程容¹, 成映霞¹, 朱立鸣¹, 雷作汉²

(1. 甘肃中医学院,甘肃兰州 730000; 2. 甘肃省中医院,甘肃兰州 730050)

关键词:痛泻二草方;溃疡性结肠炎;充血积分;组织损伤评分;肠重系数

收稿日期:2007-04-05

基金项目:甘肃省教育厅基金项目(NO 034B-05)。

作者简介:梁玉杰(1962-),男,副教授,医学学士,主要从事中医学基础,中西医结合防治脾胃病的研究,电话:13389313152。

*通讯作者:段永强, E-mail: dyq@gszy.edu.cn